

## *Leuconostoc mesenteroides* 균주를 이용한 여주 추출물 발효 및 생산물의 생리활성 특성

강정훈<sup>†</sup>

청주대학교 바이오메디컬학과  
(2018년 9월 18일 접수: 2018년 12월 24일 수정: 2018년 12월 25일 채택)

### Fermentation of *Momordica charantia* Extract using *Leuconostoc mesenteroides* and Physiological Activity of Product

Jung-Hoon Kang<sup>†</sup>

Department of Biomedical Science, Cheongju University, Chungbuk 28160, Korea  
(Received September 18, 2018; Revised December 24, 2018; Accepted December 25, 2018)

**요약** : 여주(*Momordica charantia*) 열수 추출물을 젖산균(*Leuconostoc mesenteroides*)으로 발효하여 얻은 생산물의 항산화 및 항당뇨 효과를 관찰하였다. 여주 발효물(MC-LM)과 여주 추출물(MC)의 항산화 활성은 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) radical 소거 측정법을 사용하여 관찰하였다. MC 처리군은 radical 소거활성이 거의 나타나지 않았으나 MC-LM의 경우 500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 47%의 활성이 관찰되었으며 MC-LM의 농도가 증가함에 따라 활성이 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. MC-LM은 MC에 비해 peroxy radical에 의한 DNA의 산화적 손상을 더 효과적으로 억제하였으며 MC-LM의 농도가 증가함에 따라 strand breakage의 억제가 유의적으로 증가 하였다( $p < 0.05$ ). 혈당량과 밀접한 관련이 있는  $\alpha$ -glucosidase의 활성 억제정도를 측정된 결과 MC는 8 mg/mL 농도에서  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 30.1% 감소시켰고 같은 농도에서 MC-LM은 58.9% 감소 시켰다. 또한 alloxan에 의한 RIN-m5F 췌장세포 사멸에 발효물의 영향을 관찰한 결과 MC-LM을 농도별로 처리한 군에서 세포생존율이 유의적으로( $p < 0.05$ ) 증가하였으며 1000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 MC군 보다 20% 높게 증가되었다. Alloxan에 의한  $\beta$ -cell파괴를 유도하여 RIN-m5F cell이 분비한 인슐린의 측정결과 MC-LM을 농도별로 첨가한 모든 군에서 인슐린 분비능이 증가하는 경향을 보였으며, 1000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 MC군 보다 15% 높게 증가되었다. 결론적으로 본 연구에서 관찰된 결과들을 통해 여주 발효물은 항산화 및 항당뇨 효과가 있는 것으로 확인되었다.

**주제어** : 산화적 변형, 생체고분자, 항산화 활성, 활성산소종

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: jhkang@cju.ac.kr)

**Abstract :** In this study, *Momordica charantia* (MC) fermented with *Leuconostoc mesenteroides* (MC-LM) were assessed for the antioxidant and the antidiabetic activities. Antioxidant activities of MC and MC-LM were evaluated using 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) radical. Although MC-treated groups showed little activity, 47% of activity was observed at 500  $\mu\text{g/mL}$  concentration for MC-LM and increased significantly ( $p < 0.05$ ) as MC-LM concentration increased. MC-LM more effectively inhibited the oxidative damage of DNA by peroxy radical than MC and the inhibition of the strand breakage increased significantly as MC-LM concentration increased ( $p < 0.05$ ). Measuring the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity, which is closely related to the regulation of blood sugar, resulted in MC reduced the activity of  $\alpha$ -glucosidase by 30% at 8 mg/mL and MC-LM at the same concentration by 60%. In addition, the effect of MC-LM on the cell viability of alloxan-treated RIN-m5F resulted in a significant increase in cell survival ( $p < 0.05$ ) in the group treated with MC-LM and a 20% increase in the concentration of 1000  $\mu\text{g/mL}$ . As a result of insulin secretion by alloxan-treated RIN-m5F cell, the level of insulin secretion tended to increase in all group treated with MC-LM. At the concentration of 1000  $\mu\text{g/mL}$ , the insulin secretion was increased by 15% in MC-LM group than in MC group. In conclusion, the results of this study suggest that fermented bitter melon has antioxidant and antidiabetic effects.

**Keywords :** *Momordica charantia*, ferment, antioxidant activity, antidiabetic effect, reactive oxygen species.

## 1. 서 론

현대 의학의 발전으로 인류의 평균 수명이 연장되면서 노인인구가 급속히 증가하고 있다. 노년기의 신체 변화는 대부분 감퇴적 양상을 나타내게 되는데 일반적으로 뇌혈관 및 심장혈관계의 효율성이 감소하고, 폐, 간, 심장, 신경계의 활동 등 신체 전반의 활동이 저하되면서 대사성 만성 질환이 자주 나타난다. 이중 당뇨병은 전 세계적으로 유병률이 큰 만성적인 대사성 질환으로 고혈당이라는 특징적인 증상을 나타내는데 고령화 사회로 진입하면서 2050년에는 예상 당뇨병 환자 수가 약 600만명까지 늘어날 것으로 예측되고 있다[1]. 당뇨병은 췌장으로부터 인슐린 분비 감소 또는 분비된 인슐린의 각 장기에 대한 작용성 감소에 기인한다. 만성적인 고혈당은 체내 단백질을 당질화시키고 눈, 신장, 신경 및 관절 등에 2차 합병증을 유발시킨다. 당뇨병은 현재 완치가 어려워, 식이요법이나 운동요법으로 혈당치를 조절하여 예방하거나 대부분의 당뇨병환자가 경구 혈당 강하제를 지속적으로 복용하여 당뇨병의 악화를 지연시키고 있다[2]. 그러나 대표적인 당뇨병 치료약인 설폰요소제(sulfonylurease), 비구아나이드

(biguanides), 아카보즈(acarbose), 다이아자이드(thiazide) 계열의 약품은 부분적인 대사 과정에만 인위적으로 작용하기 때문에, 부작용과 내성을 피할 수 없다[3]. 이와 같은 문제를 해결하기 위해 최근에는 천연물을 이용하여 보다 안전한 혈당 강하제를 개발하려고 하는 추세이다[4]. 현재까지 더덕 추출물이 제2형 당뇨에 미치는 영향[5], 뽕잎과 녹차 혼합 분말의 항당뇨 효과[6], 한약 복합체 추출물의 혈당 강하 효과[7] 등의 천연물을 이용한 항당뇨 연구가 보고된 바 있다. 최근 민간에서 당뇨 질환과 관련된 약용식물로서 여주에 대한 관심이 증대되고 있는 가운데 재배가 용이하여 재배면적도 증가되는 추세이며 미국과 한국에서 혈당 강하를 위한 음료와 차 등으로 사용되고 있다[8]. 이와 같이 여주가 민간에서 널리 사용되고 있는 상황에 비해 여주의 이용 및 효능에 관한 과학적 분석 연구 등은 아직 미흡한 실정이다.

여주 (*Momordica charantia* Linn)는 박과(Cucurbitaceae)에 속하는 약용식물로 영문으로는 bitter melon 또는 bitter melon이라고 하며 아시아, 아메리카, 아프리카 및 카리브해 등 전 세계적으로 재배되는 열대와 아열대 작물이다. 그 열

매는 세계에서 가장 쓴맛 채소 중 하나로 맛있는 열매이지만, 그 기능은 다양하고 뚜렷한 활성을 나타내는 식물로 부각되고 있다. 예로부터 우리나라에서는 집 울타리에 관상용으로 심었던 여주가 최근에는 미국이나 유럽 등 일부 선진국에서 다양한 건강식품으로 활용되고 있다. 여주의 쓴맛이 위를 자극하여 소화액 분비를 촉진하고 식욕이 생기도록 하고, 건위, 정장 작용도 있다. 또한 동남아시아의 전통 의학에선 피부병, 야맹증, 기생충, 류머티스, 통풍, 신체 허약 등에 효과가 있는 식품으로 여겨 이용해 왔다. 최근 현대과학의 발달로 여주가 당뇨병에 효과가 있는 것으로 밝혀지면서 많은 관심을 받고 있다. 여주는 비타민 C, 사포닌, 알칼로이드, 글루코사이드 등 유용물질이 풍부한 것으로 알려져 있다 [8]. 또한 여주의 각 부위별 메탄올 추출물의 항산화 효과를 측정 한 결과 잎의 추출물에서 가장 높은 항산화 효능을 나타냈으며 [9]. 여주 열매의 에탄올 추출물에서 높은 DPPH 라디칼 소거능이 나타난다고 보고된 바 있다 [10].

최근 유용 미생물을 이용해 천연물의 생리활성을 증진시키는 주요한 기술로 발효가 널리 이용되고 있고, 발효 농차의 항당뇨 효과 [7]와 발효버섯의 항산화 활성 [11] 등 발효를 통해 기능성을 증진시킨 연구가 보고된 바 있다. 그러나 현재까지 여주는 여주추출물과 과즙을 이용한 연구는 활발한 반면, 발효시킨 여주의 기능성 증진 효과에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 젖산균 발효 여주 추출물의 항산화 및 항당뇨 효과를 생화학 및 세포생물학적 방법을 이용해 검증하고 여주 발효물이 기능성 식품개발에 응용될 수 있는지를 연구하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험재료

본 실험에 사용한 여주는 2016년 4월에 충북 오창에서 채취한 것을 사용하였으며, 발효균주는 젖산균(*Leuconostoc mesenteroides* LM)을 사용하였다. Phosphate buffer saline (PBS), dimethyl sulfoxide (DMSO), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), 등은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 2,2'-Azino-bis

(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)는 Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany)에서 구입하여 사용하였고, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)는 Wako (Chuo-Ku, Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

### 2.2. 여주 발효

여주의 발효는 Park 등 [12]의 방법을 변형하여 다음과 같이 수행했다. 여주를 수세한 후 실온에서 3-4일간 건조시켜 수분함량을 조절 한 다음 건조물 100 g에 900 mL의 물을 첨가하여 3시간 동안 침지 시켜준 후 121°C의 고온에서 2시간 동안 고압멸균 하였다. 젖산균 발효를 위해 여주 열수 추출물 1 L에 젖산균 100 mL을 접종 후 30°C에서 4일 동안 배양하여 pH 3.8 이하로 만들었다. 발효물을 4°C에서 30분 동안 7,600 × g로 원심분리하여 불용성 침전물을 제거하고 상층액을 동결건조 하여 실험에 사용하였다.

### 2.3. ABTS radical 소거활성

ABTS radical 소거활성을 Brand-Williams 등 [13]의 방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.5 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 37°C 암실에서 12시간 동안 반응시킨 후 희석하여 사용하였다. ABTS 900 μL에 DMSO 50 μL와, AC-HE 50 μL를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 다음 식(1)에 의해 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \{1 - (A_{\text{Experiment}}/A_{\text{Control}})\} \times 100 \quad (1)$$

### 2.4. DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

Peroxyl radical에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용을 Kang 등 [14]의 방법을 이용하여 관찰하였다. DNA는 pUC19(100 μg/mL) plasmid DNA를 사용하였고 DNA의 산화적 손상을 유발시키기 위해 10 mM AAPH를 사용하여 peroxy radical 생성시켰다. 반응액에 MC 및 MC-LM을 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 gel electrophoresis를 통해 산화적 손상에 대한 보호 작용을 확인하였다.

## 2.5. $\alpha$ -Glucosidase 저해활성 측정

$\alpha$ -Glucosidase 저해활성은 Choe 등[15]의 방법으로 측정하였다. 0.1 M phosphate 완충액(pH 6.8)에 용해한 2.5 mM의  $p$ -nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside 100  $\mu$ L, 0.2 unit/mL의  $\alpha$ -glucosidase(Sigma-Aldrich) 및 시료 추출물 50  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 이어 0.1 M NaOH 100  $\mu$ L로 반응을 정지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다[12].

## 2.6. Alloxan에 의한 세포사멸에 대한 보호 작용

췌장세포주인 RIN-m5F cell을 생명공학 연구원으로부터 분양 받아 사용하였으며 alloxan에 대한 보호 효과는 Kim 등[16]의 방법으로 측정하였다. 96 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well의 농도로 cell을 분주하여 10% FBS-RPMI-1640 배지로 배양하였다. 세포밀도가 70% 정도 되면 새 배지로 교환하여 주고, 각 군별로 시료를 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 동안 배양하였다. Free-glucose RPMI-1640 배지로 교환하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 각 군별 시료를 다시 첨가하고 각 well당 4 mM alloxan(Sigma-Aldrich)을 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 동안 배양하였다. 10% FBS-RPMI-1640 배지로 2회 세척 후 MTT (Thiazoly blue tetrazolium bromide, 5 mg/mL)와 10% FBS-RPMI-1640 배지를 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 30분간(빛 차단) 방치하였다. 배양액을 버리고 각 well에 dimethyl sulfoxide(DMSO) 100  $\mu$ L를 가하여 세포 내 formazan crystal을 용해시키고 380nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

## 2.7. Insulin 분비능 측정

췌장세포에서 insulin 분비능은 Kim 등[16]의 방법으로 측정하였다. RIN-m5F cell을  $2 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주하여 10% FBS-RPMI-1640 배지로 배양하였다. 세포밀도가 70% 정도 되면 새 배지로 교환하여 주고, 각 군별로 시료를 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 동안 배양하였다. Free-glucose RPMI-1640 배지로 교환하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 각 군별 시료를 다시 첨가하고 각 well당 4 mM alloxan(Sigma-Aldrich)을 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 동안 배양하였다. Cell culture supernatant를 이용하여 세포에서

분비된 인슐린의 양을 Rat/Mouse Insulin ELISA kit (Merk Millipore)로 측정하였다.

## 2.8. 통계처리

실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였으며, 모든 실험값은 3회 이상 반복 실시한 결과를 평균 $\pm$ 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 각 군 간의 측정치 비교는  $p < 0.05$ 의 유의수준에서 student's  $t$ -test를 이용하여 각 구간의 유의적 차이를 검증하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. ABTS radical 소거활성

ABTS radical 소거활성은 항산화 물질에 의해 radical 특유의 짙은 청록색이 하늘색 및 투명색으로 탈색되는 것을 이용한 측정법으로 이는 hydrogen-donating antioxidant와 chain breaking antioxidant를 측정할 수 있고 aqueous phase 및 organic phase 모두에 적용이 가능하다는 점이 특징이다[17]. 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid의 ABTS radical 소거활성은 50  $\mu$ g/mL 농도에서 100%로 나타났으며 MC 처리군은 radical 소거활성이 거의 나타나지 않았으나 MC-LM의 경우 500  $\mu$ g/mL 농도에서 47%의 활성이 관찰되었다(Fig. 1).

또한 MC-LM의 농도가 증가함에 따라 활성이 유의하게( $p < 0.05$ ) 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 식물에 널리 존재하는 폴리페놀 화합물은 식품에 많이 포함되어 있으며, 천연항산화제로의 작용이 우수하다[18,19]. 폴리페놀 함량이 높은 식물은 각종 질병의 치료 및 예방에 효과가 있어 건강보조식품 재료로 각광 받고 있다. 한편 플라보노이드는 식물에 널리 존재하는 노란색계열의 색소로 약 4,000여 종의 화합물로 존재하며 항산화 작용, 순환기계 질환의 예방, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스, 지질저하 작용, 면역증강 작용, 모세혈관 강화작용 등이 보고된 바 있다[20-22]. 최근 보고에 의하면 건여주의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 36.08 mg GAE/g, 15.66 mg TAE/g으로 나타났다[23]. 따라서 식물에 함유된 플라보노이드나 폴리페놀 화합물은 천연 항산화제로써 작용할 수 있으며 항

산화 작용에 영향을 나타낸다는 선행연구[16,17]에 근거하여 여주발효물이 천연항산화제로서 이용가치가 있을 것으로 판단된다.

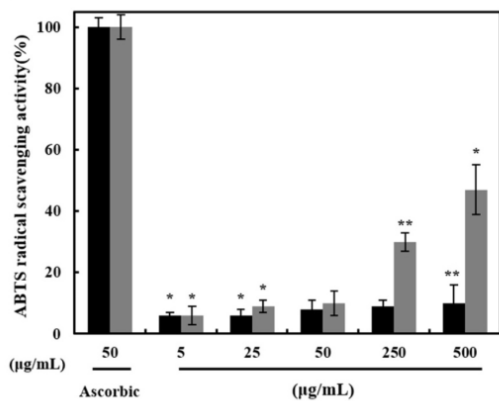


Fig. 1. ABTS radical scavenging activity of fermented *Momordica charantia* (MC) with *Leuconostoc mesenteroides* (MC-LM). The reaction mixture contained 7 mM ABTS and 2.5 mM potassium persulfate in the presence or absence of various concentrations of MC (black bar), MC-LM (grey bar) at 37°C for 10 min. The values represent the mean±S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the ascorbic acid treated group. \*p<0.05, \*\*p<0.01

### 3.2. DNA의 산화적 손상에 대한 보호 작용

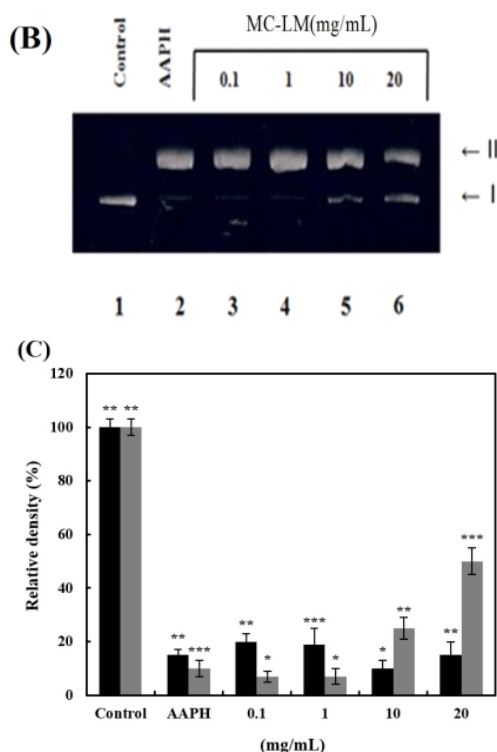
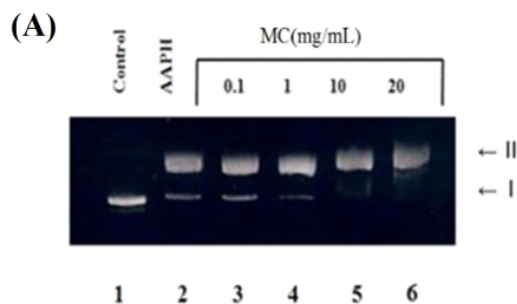


Fig. 2. Protective effects of fermented *Momordica charantia* (MC) with *Leuconostoc mesenteroides* (MC-LM) on DNA strand breakage induced by peroxy radical. pUC 19 DNA was incubated with 10 mM AAPH in the presence of various concentrations of MC-LM at 37°C for 2 h. (A) Lane 1, control DNA; lane 2, lane 1 + AAPH; lane 3, lane 2 + 0.1 mg/mL MC; lane 4, lane 2 + 1 mg/mL MC; lane 5, lane 2 + 10 mg/mL MC; lane 6, lane 2 + 20 mg/mL MC. (B) Lane 1, control DNA; lane 2, lane 1 + AAPH; lane 3, lane 2 + 0.1 mg/mL MC-LM; lane 4, lane 2 + 1 mg/mL MC-LM; lane 5, lane 2 + 10 mg/mL MC-LM; lane 6, lane 2 + 20 mg/mL MC-LM. (C) Relative staining intensity of agarose gel was analyzed by densitometric scanning. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

MC-LM이 DNA의 산화적 손상을 억제하는 지를 알아보았다. AAPH는 용액 상에서 peroxy radical을 효과적으로 생성하며 이들은 지질이나 DNA와 반응하여 산화적 손상을 유도한다 [24,25]. Fig. 2 에서 보는 바와 같이 (A)와 (C)의 lane 2에서는 AAPH 처리하여 DNA의 산화적 손상을 유도한 결과 DNA의 strand breakage가 일어났고 (A)와 (C)의 lane 3-6은 MC와 MC-LM을 첨가하여 peroxy radical에 의한 DNA의 손상을 억제하는 지를 확인한 결과로 MC를 처리한 군에서는 농도에 따른 유의적 변화가 관찰되지 못하였고 억제효과도 매우 낮았다. 반면 MC-LM을 처리한 군은 농도가 증가함에 따라 strand breakage의 억제가 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ).

생체 내에서 활성산소에 의한 DNA의 변형에 관한 연구는 많이 알려져 있다. 일반적으로 활성산소종 중에 하나인 superoxide anion, hydroxyl radical 등은 DNA에 손상을 주어 DNA strand breakage와 base modification, deoxyribose degradation을 유발한다[26-28]. 이와 같은 현상은 돌연변이나 노화 및 각종 질환의 원인이 되고 있다[29,30]. 따라서 MC-LM은 DNA의 산화적 손상을 보호함으로써 노화 및 질병 예방에 도움이 될 것이다.

### 3.3. $\alpha$ -Glucosidase 저해활성 측정

음식물로 섭취된 전분(Starch)은 amylase에 의해 oligosaccharide로 분해되고  $\alpha$ -glucosidase에 의해 포도당으로 분해된다.  $\alpha$ -Glucosidase는 소장점막의 brush border 효소로서 이당류를 단당류로 분해하는 기능을 갖는데, 이 효소의 억제제를 복용할 경우 이러한 단당류로의 분해가 지연되어 식후 혈당의 상승이 완만해진다[31,32]. 당뇨 예방 소재로 잘 알려진 돼지감자 부위별 메탄올 추출물(5 mg/mL)의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 꽃, 잎, 뿌리에서 각각 41.08%, 55.67%, 60.76%로 보고된 바 있다[33]. 본 실험에서는 여주 추출물과 발효물이  $\alpha$ -glucosidase의 효소 활성을 억제할 수 있는 어떤 영향을 미치는 지를 알아보았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 MC와 MC-LM 모두  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 농도에 비례하여 유의적으로 억제하였다( $p < 0.05$ ). 그러나 MC에 비해 MC-LM이  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 더 강하게 억제하였다. MC는 8 mg/mL 농도에서  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 30.1% 감소시켰고

같은 농도에서 MC-LM은 58.9% 감소 시켰다. 이와 같은 결과는 MC-LM이 MC에 비해 당뇨를 예방할 수 있는 효과가 더 높다고 판단되었다.

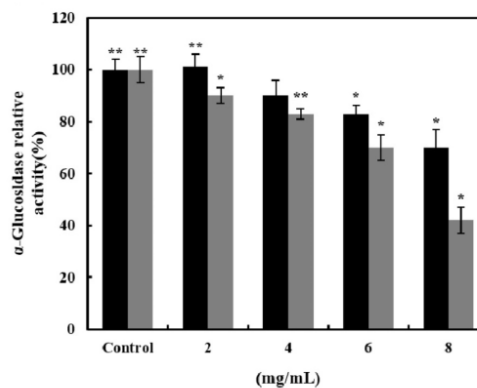


Fig. 3. Protective effects of fermented *Momordica charantia* (MC) with *Leuconostoc mesenteroides* (MC-LM) on the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity in the presence of various concentrations of MC (black bar) or MC-LM (grey bar). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

### 3.4. Alloxan에 의한 세포사멸에 대한 보호 작용

췌장세포주 RIN-m5F cell을 96-well plate에 분주하여 24시간 배양 한 후 alloxan 처리 2시간 전 MC와 MC-LM을 농도별 (1-1,000 ug/ml)로 처리하고 4 mM alloxan을 처리하여 1시간 배양한 후 세포 생존율은 MTT assay를 통해 Cytation 3 Imaging Reader (BioTek Instruments)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 MC를 처리한 군에서는 세포 사멸을 미약하게 억제한 반면 MC-LM을 처리한 군에서는 농도가 증가함에 따라 alloxan에 의한 세포의 사멸을 더 강하게 억제하였다. 기존 보고에 의하면 돼지감자 추출물은 alloxan으로 처리한 췌장세포를 보호한다고 알려졌고 이는 돼지감자의 주성분인 inulin에 의한 효과인 것으로 알려졌다. 여주의 경우 혈당 강하 기능이 있는 카란틴이[8] 췌장세포의 보호 효과를 나타낼 수도 있을 것이다. 따라서 MC-LM은 여주의 카란틴 성분과 발효를 통해 생산되는 유도체 등이 alloxan의 영향을 막아내

어 췌장세포의 파괴를 감소시킴으로써 췌장  $\beta$ -cell을 보호하는 효과가 있을 것으로 사료된다.

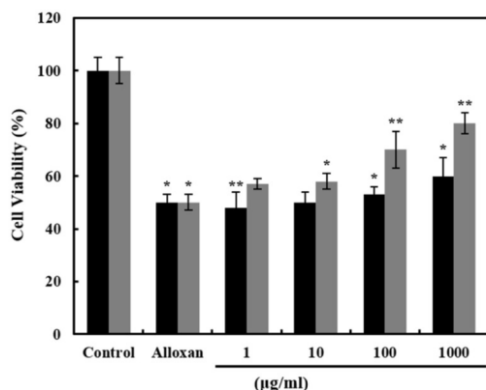


Fig. 4. Protective effects of fermented *Momordica charantia* (MC) with *Leuconostoc mesenteroides* (MC-LM) on cell death induced by alloxan. RIN-m5F cells were treated with 4 mM alloxan the presence or absence of varying concentrations of MC (black bar) or MC-LM (grey bar) and cell viabilities were estimated by with a colormetric assay using MTT. The values represent the mean  $\pm$  S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

### 3.5. 인슐린 분비 증가 효과

RIN-m5F cell을 96-well plate에 분주하여 24 시간 배양 한 후 alloxan 처리 2시간 전 MC와 MC-LM을 농도별 (1-1,000 ug/ml)로 처리하고 4 mM alloxan을 처리하여 1시간 배양함. 배양 후 배양액을 이용하여 세포에서 분비된 인슐린의 양을 Rat/Mouse Insulin ELISA kit (Merk Millipore)로 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 시료를 첨가하지 않은 alloxan군에 비해 MC(A)와 MC-LM(B)을 처리하였을 때 각 군 모두 농도가 증가함에 따라 인슐린 분비능이 비례적으로 증가하였으나 MC에 비해 MC-LM이 1,000 ug/ml 농도에서 인슐린 분비능이 약 15% 높은 것으로 관찰되었다. Alloxan에 의한 췌장세포 파괴를 유도하면 인슐린 분비능에 영향을 영향을 미치게 되는데[34] MC-LM을 첨가한 군에

서 인슐린 분비능이 유의적으로 증가한 것으로 보아 MC-LM은 alloxan에 의한 췌장세포의 파괴를 효과적으로 막아줌으로서 인슐린의 분비능을 증가시키는 것으로 사료되었다. 이상과 같은 결과를 종합해 볼 때 MC-LM은 MC에 비해 항산화 기능과 항당뇨 효과가 높다고 판단되었다.

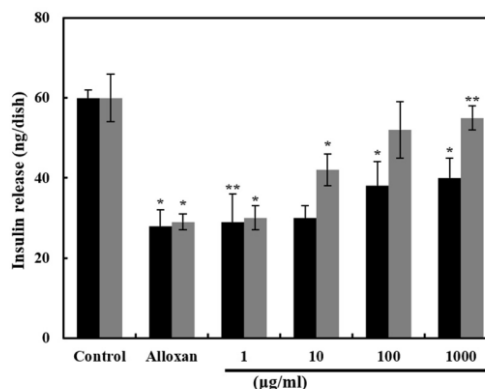


Fig. 5. Protective effects of fermented *Momordica charantia* (MC) with *Leuconostoc mesenteroides* (MC-LM) on the secretion of insulin from the cell induced by alloxan. RIN-m5F cells were treated with 4 mM alloxan in the presence or absence of varying concentrations of MC (black bar) or MC-LM (grey bar) and the amounts of insulin were estimated by using Rat/Mouse Insulin ELISA kit (Merk Millipore). The values represent the mean  $\pm$  S.D. for triplicate experiments. Significantly different from the control, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

## 4. 결론

본 연구에서는 여주 열수 추출물(MC)에 젖산균을 접종하여 배양 발효시켜 제조한 발효물(MC-LM)의 항산화 활성 및 항당뇨 효과를 확인한 결과, MC에 비해 MC-LM이 항산화 활성 및 항당뇨 효과가 뛰어난 것으로 관찰되었다.

1. MC-LM은 MC에 비해 500 ug/mL 농도에서 ABTS radical 소거활성이 37% 높게 나

타냈으며, 농도가 증가함에 따라 활성이 유의하게( $p < 0.05$ ) 증가하였다.

2. MC-LM은 peroxy radical에 의한 DNA의 산화적 손상을 효과적으로 억제하였다.
3. MC-LM은 alloxan에 의한 세포사멸을 억제하여 세포생존율의 유의한 증가를 보였으며, 세포내의 인슐린 생성도 현저히 증가시켰다.

이상과 같은 결과를 통해, 젯산균으로 발효시킨 여주 발효물은 여주 추출물에 비해 항산화 활성 및 항당뇨 효과가 뛰어난 것으로 판단되어 이를 이용한 기능성 식품 개발이 가능할 것으로 사료된다.

### Referneces

1. J. Lee, H. Park, "Relationships between diabetic knowledge, self-care behaviors and HbA1c in diabetic patients using public hospitals", *J. Korean Acad. Fundam. Nurs*, Vol.21, No.3 pp. 243-252, (2014).
2. A. K. Meena, P. Bansal, S. Kumar, "Plants-herbal wealth as a potential source of ayurvedic drugs", *Asian J. Traditional*, Vol.4, No.4 pp. 152-170, (2009).
3. S. Y. Lee, S. L. Park, Y. D. Nam, S. H. Yi, and S. I. Lim, "Anti-diabetic effects of fermented green tea in KK-Ay diabetic mice", *Korean J. Food Sci. Technol*, Vol.45, No.4 pp. 488-494, (2013).
4. J. O. Kim and G. D. Lee, "Hypoglycemic effects of a medicinal herb mixture prepared through the traditional antidiabetic prescription", *Korean J. Food Preserv*, Vol.18, No.6 pp. 923-929, (2011).
5. W. K. Yun, H. J. Bae, Y. J. Kim, J. O. Kwon, M. H. Im, H. D. Cho, T. Kim, "Effect of the supplementation of *Coconopsis lanceolata* extract on lipid metabolism amelioration in type 2 diabetes mouse model induced by high fat diet", *Korean J. Food Preserv*, Vol.21, No.1 pp. 107-113, (2014).
6. H. K. Son, H. J. Han, and J. J. Lee, "Anti-diabetic effect of the mixture of mulberry leaf and green teapowder in rats with streptozotocin-induced diabetes", *Korean J. Food Preserv*, Vol.21, No.4 pp. 549-559, (2014).
7. H. S. Lee, H. J. Kong, E. H. Lee, S. J. Hwang, H. A. Jung, M. L. Kim, E. M. Choi, J. H. Jang, K. M. Yang, "Hypoglycemic effects of boiled rice made from unpolished rice, job' tear, and extract from medicinal herbs mixture on diabetic rat", *Korean J. Herbology*, Vol.29, No.3 pp. 59-70, (2014).
8. H. J. Lee, J. H. Moon, W. M. Lee, S. G. Lee, A. K. Kim, Y. H. Woo, D. K. Park, "Charantin contents and fruit characteristics of bitter melon (*Momordica charantia* L.) accessions", *J Bio-enviroment control*, Vol.21, No.4 pp. 379-84, (2012).
9. Y. Park, H. O. Boo, Y. L. Park, D. H. Cho, H. H. Lee "Antioxidant activity of *Momordica charantia* L. extracts" *Korean J. Medicinal Crop. SAcI*, Vol.15, No.1 pp 56-61, (2007).
10. E. Y. Kim, I. H. Baik, J. H. Kim, S. R. Kim, M. R. Rhyu, "Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants" *Korean J. Food Sci Thechnol*, Vol.36, No2 pp. 333-338, (2004).
11. H. S. Yang, Y. J. Choi, H. H. Oh, J. S. Moon, H. K. Jung, K. J. Kim et al, "Antioxidative activity of mushroom water extracts fermented by lactic acid bacteria", *J. Korean Soc. Food Sci.i Nutr*, Vol.43, No.1 pp. 80-85, (2014).
12. H. S. Park, W. K. Kim, H. P. Kim, Y. G. Yoon, "The efficacy of lowering blood glucose levels using the extracts of fermented bitter melon in the diabetic mice" *J. Appl. Biol. BChem*, Vol.58, No.3 pp. 259-265, (2015).
13. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *Food Sci*



- Technol*, Vol.28, No.1 pp. 25, (1995).
14. J. H. Kang, S. M. Kim, "DNA cleavage by hydroxyl radicals generated in the Cu,Zn-Superoxide dismutase and hydrogen peroxide system", *Mol. Cells*, Vol.7, No.6 pp. 777-782, (1997).
  15. M. Choe, D. J. Kim, H. J. Lee, J. K. You, D. J. Seo, J. H. Lee, M. J. Chung, "A study on the glucose regulating enzymes and antioxidant activities of water extracts from medicinal herbs", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*, Vol.37, No.5 pp. 542-547, (2008).
  16. J. L. Kim, C. R. Bae, Y. S. Cha, "Helianthus tuberosus extracts has anti-diabetes effects in HIT-T15 cells" *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr*. Vol.39, No.1 pp. 31-35 (2010).
  17. R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, "Standardized method for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplement", *J. Agric. Food Chem*, Vol.53, No.10, pp. 4290, (2005).
  18. M. Sato, N. Ramarathnam, Y. Suzuki, T. Ohkubo, M. Takeuchi, H. Ochi, "Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources", *J. Agric. Food Chem*, Vol.44, No.1 pp. 37-41, (1996).
  19. D. F. Fitzpatrick, S. L. Hirschfield, R. G. Coffey, "Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products", *Am. J. Physiol*, Vol.265, pp. H774-H778, (1993).
  20. S. Yoon, H. K. Kwak, Y. K. Kim, H. K. Kim, M. S. Park, K. J. Yeum, H. S. Oh, M. J. Lee, J. H. Lee, G. E. Ji, "Functional foods. Life Science Publishing Co", *Seoul, Korea*, pp. 222-231, (2006).
  21. Z. Jia, M. Tang, J. Wu, "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals", *Food Chem*, Vol.64, No.4 pp. 555-559, (1999).
  22. M. G. L. Hertog, P. C. H. Hollman, M. B. Katan, "Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands." *J. Agric. Food Chem*, Vol.40, No.12 pp. 2379-2383, (1992).
  23. R. L. Lee, "Nutritional Components and Antioxidant Activity of Dry Bitter Melon (*Momordica charantia* L.) J Korean Soc", *Food Sci. Nutr*, Vol.45, No.4 pp. 518-523, (2016).
  24. E. Niki, "Antioxidants in relation to lipid peroxidation", *Chem. Phys. Lipids*, Vol.44, No.2-4 pp. 227 (1987).
  25. K. Hiramoto, H. Hohkoh, K. Sako, K. Kikugawa, "DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride(AAPH)", *Free Radic. Res. Commun*, Vol.19, No.5 pp. 323-332, (1993).
  26. B. N. Ames, "Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases", *Science*, Vol.221, No.4617 pp. 1256-1264, (1983).
  27. P. A. Cerutti, "Prooxidant states and tumor promotion", *Science*, Vol.227, No.4685 pp. 375-381, (1985).
  28. J. L. Sagripanti, K. H. Kraemer, "Site-specific oxidative DNA damage at polyguanosines produced by copper plus hydrogen peroxide", *J. Biol Chem*, Vol.264, No.3 pp. 1729-1734, (1989).
  29. T. Finkel, N. J. Holbrook, "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing", *Nature*, Vol.408, No.6809 pp. 239-247, (2000).
  30. S. Kawanishi, Y. Hiraku, S. Oikawa, "Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging", *Mutat Res*, Vol.488, No.1 pp. 65-76, (2001).
  31. J. E. Kim, S. I. Joo, J. H. Seo, S. P. Lee, "Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract

- obtained by the treatment of different solvents and enzymes", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* Vol.**38** pp. 989-995, (2009).
32. J. H. Park, M. R. Baek, B. H. Lee, G. H. Yon, S. Y. Ryu, Y. S. Kim, " $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of compounds from roots extract of *Pueraria thunbergiana*" *Korean J. Medicinal Crop Sci* Vol.**17**, No.5 pp. 357-362. (2009).
33. C. H. Lee, Y. R. Lee, "Antioxidant and antidiabetic activities of methanol extracts from different parts of Jerusalem artichoke(*Helianthus tuberosus L*)" *Korean J. Food Nutr.* Vol.**29**, No.1 pp. 128-133. (2016).
34. D. C. Weaver, M. L. McDaniel, S. P. Naber, C. D. Barry, P. E. Lacy, "Alloxan stimulation and inhibition of insulin release from isolated rat islets of Langerhans" *Diabetes* Vol.**27**, No.12 pp. 1205-1214. (1978).